

## АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В РАЗНЫЕ СТАДИИ ПЕРИТОНИТА

ШТУРИЧ И.П.\*, ШИЛЕНКО В.Н.\*, КИРПИЧЕНКО Л.Н.\*\*

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;*

*кафедра факультетской хирургии\*,*

*кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом ФПК и ПК\*\**

**Резюме.** В статье представлены результаты исследования активности протеолитических процессов в сыворотке крови у 42 больных перитонитом в разные стадии заболевания. Установлено, что при перитоните происходят изменения активности и/или содержания компонентов системы протеолиза в сыворотке крови в зависимости от стадии перитонита. В сыворотке крови наиболее значимым изменениям подвергается общая протеолитическая активность, которая в стадию полиорганной недостаточности увеличивается в 13,2 раза по сравнению с токсической стадией. Источником протеиназ и их эндогенных ингибиторов является не только печень, но и клетки крови – моноциты, лимфоциты, сегментоядерные нейтрофилы. В соответствии с обнаруженными корреляционными взаимоотношениями, в разные стадии перитонита участвуют различные клетки.

**Ключевые слова:** перитонит, протеолитические ферменты, ингибиторы протеолитических ферментов, хирургическая инфекция.

**Abstract.** The results of the study of proteolytic processes activity in blood serum of 42 patients with peritonitis in different stages of the disease are presented in this article. It is determined that in peritonitis the changes of activity and/or concentration of proteolysis system components in blood serum occur depending on its stage.

The total proteolytic activity which in the polyorganic failure stage increases 13,2 times in comparison with the toxic one undergoes the most significant changes in blood serum.

Not only blood cells – monocytes, lymphocytes, segment-nuclear neutrophils but also the liver are considered by the authors to be the source of proteinases and their endogenic inhibitors.

In accordance with the detected correlative interrelationship different cells take part in different stages of peritonitis.

Тяжесть течения перитонита определяет стратегию лечебных мероприятий для каждого больного. Изменение активности протеолитических ферментов, а также их эндогенных ингибиторов позволяет более точно определить степень эндогенной интоксикации и, как следствие, назначить адекватное лечение.

Цель настоящего исследования – на основе исследования интенсивности протеолиза в сыворотке крови изучить возможность

использования показателей активности протеолитических процессов для оценки тяжести течения перитонита и прогнозирования исхода заболевания.

Для этого мы исследовали интенсивность протеолитических процессов в сыворотке крови у больных перитонитом на различных стадиях заболевания.

### Методы

Материалом для исследования служила сыворотка крови 42 больных перитони-

том (13 больных в реактивной стадии, 14 больных в токсической стадии и 15 больных в стадии полиорганной недостаточности). Контролем служили здоровые люди.

В сыворотке крови определяли общую протеолитическую активность (ОПА) по методу Erlanger B.F. et al. [4] с нашими модификациями, используя в качестве субстрата N- $\alpha$ -бензоил-D,L-аргинина паранитроанилида (БАПНА). Основой для определения активности ингибиторов служил метод, предложенный Т.А. Хватовым и В.Б. Беловой [3]. Определяли  $\alpha_1$  - антипротеиназный ингибитор (АПИ),  $\alpha_2$  - макроглобулин (МГ), суммарную ингибиторную емкость (СИЕ) сыворотки крови (соответствовала сумме активности основных ингибиторов – АПИ + МГ) и индекс протеолиза (ИП). Индекс протеолиза (соотношение общей протеолитической активности к сумме активности основных ингибиторов протеиназ) отражает напряженность или «управляемость» протеолитических процессов.

Данные обработаны с помощью программы Statistika 6.0 (модуль «Nonparametrical Statistiks»). Исследуемые показатели не подчинялись нормальному распределению, поэтому описывались в терминах – медиана, верхняя и нижняя квартили. Для сравнения групп использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. Для нахождения взаимосвязи между показателями использовался непараметрический коэффициент корреляции Спирмана.

### Результаты и обсуждение

Обнаружено, что в реактивную стадию перитонита в сыворотке крови наблюдался

рост активности одного из основных ингибиторов протеиназ – АПИ на 46,95% при практически неизменном содержании МГ, что приводило к росту СИЕ на 24,27% (табл. 1). Одновременно происходило снижение общей протеолитической активности на 45,43% (табл. 1). Индекс протеолиза при этом также уменьшался (на 56,22%).

В реактивную стадию перитонита имело место четкая корреляционная зависимость между количеством сегментоядерных лейкоцитов и ОПА ( $r=0,69$ ,  $p=0,025$ ), а также между содержанием этих лейкоцитов и ИП ( $r=0,804$ ,  $p=0,009$ ).

Наблюдаемые изменения, по-видимому, связаны с тем, что в ответ на воспалительный процесс происходит выброс одного из быстрых реактантов острой фазы – АПИ. АПИ способен необратимо связывать протеолитические ферменты, которые обеспечивают измеряемую нами общую протеолитическую активность. Это объяснение подтверждается и количественной сопоставимостью разнонаправленных изменений АПИ и ОПА (46,95% и 45,43 %, соответственно).

В токсическую стадию перитонита активность АПИ снижалась до контрольных значений, а МГ – увеличивалась (на 31% по сравнению с реактивной стадией), что в результате не сказалось на уровне СИЕ (табл. 2). ОПА и ИП имели тенденцию к росту, но достоверно не отличались от уровня предыдущей стадии (табл. 2).

Снижение активности АПИ на фоне роста МГ в токсическую стадию перитонита может быть следствием нескольких причин.

Таблица 1  
Интенсивность протеолитических процессов в сыворотке крови больных перитонитом (реактивная стадия, n=13)

Показатель	Контроль	Медиана	Нижняя квартиль	Верхняя квартиль	Значение p (U-критерий Манна-Уитни)*
АПИ, г/л	2,13	3,13	1,14	3,84	0,07
МГ, г/л	3,02	3,28	2,42	3,53	0,006
ОПА, нмоль/лс	11,16	6,09	0	20,3	0,001
СИЕ, г/л	5,15	6,40	3,29	6,95	0,053
ИП, усл.ед.	2,17	0,95	0	3,08	0,079

\*Примечание: достоверность изменений изучаемых показателей в группе больных перитонитом в реактивной стадии с показателями в стадии полиорганной недостаточности.

Таблица 2

**Интенсивность протеолитических процессов в сыворотке крови больных перитонитом  
(токсическая стадия, n=12)**

Показатель	Медиана	Нижняя квартиль	Верхняя квартиль	Значение р (U-критерий Манна-Уитни)*
АПИ, г/л	2,11	0,76	2,2	0,019
МГ, г/л	4,3	3,32	24,07	0,025
ОПА, нмоль/лс	8,12	0	52,79	0,54
СИЕ, г/л	6,41	4,66	26,31	0,78
ИП, усл.ед.	1,27	0	4,36	0,3

*\*Примечание: достоверность изменений изучаемых показателей в группе больных перитонитом в токсической стадии с показателями в реактивной стадии.*

Уменьшение активности АПИ может быть связано с необходимостью инактивации массивного количества протеолитических ферментов, поступивших в сыворотку крови как из собственных клеток, так и из микроорганизмов. С другой стороны, известно, что МГ способен резко усиливать диссоциацию комплексов АПИ-протеиназа, что приводит к освобождению активного ингибитора. Но, поскольку роста СИЕ не наблюдалось, по-видимому, происходит истинное снижение концентрации белка-ингибитора.

Снижение активности АПИ может происходить в результате уменьшения синтетической функции печени, которая является основным продуцентом сывороточных серпиновых ингибиторов. Однако в таком случае не наблюдался бы рост активности МГ, так как постоянство пула МГ в системе кровообращения обеспечивается большей частью гепатоцитами [2].

Возможно, уменьшение активности АПИ связано с истощением его периферического пула.

Повышение активности МГ в токсическую стадию может быть связан с ростом его

синтеза. К факторам, стимулирующим биосинтез МГ, относят HSF (фактор, стимулирующий гепатоциты), который продуцируют полиморфноклеточные лейкоциты из перитонеального экссудата и из периферического кровотока. Синтез МГ может также осуществляться периферическими мононуклеарами, их содержание в токсическую стадию увеличивалось по сравнению с содержанием в реактивную стадию. Возможность лейкоцитов как источника МГ в эту стадию косвенно подтверждается положительной корреляцией этих показателей ( $r=+0,62$ ,  $p=0,05$ ).

Биосинтез МГ стимулируется также интерлейкином-6 (ИЛ-6), который индуцирует транскрипцию гена МГ, усиливает секрецию МГ гепатоцитами и одновременно подавляет секрецию  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора, который является основным ингибитором сыворотки крови.

В токсическую стадию перитонита происходит повреждение печени и из поврежденных гепатоцитов вместе с другими ферментами в кровеносное русло выходят протеолитические

Таблица 3

**Интенсивность протеолитических процессов в сыворотке крови больных перитонитом  
(стадия полиорганной недостаточности, n=13)**

Показатель	Медиана	Нижняя квартиль	Верхняя квартиль	Значение р (U-критерий Манна-Уитни)*
АПИ, г/л	3,72	3,21	5,6	0,0002
МГ, г/л	4,03	3,69	10,9	0,8
ОПА, нмоль/лс	108,62	24,36	140,09	0,004
СИЕ, г/л	7,75	6,97	8,17	0,22
ИП, усл.ед.	14,02	3,2	17,2	0,36

*\*Примечание: достоверность изменений изучаемых показателей в группе больных перитонитом в стадии полиорганной недостаточности с показателями в токсической стадии.*

ферменты, так как наблюдается положительная корреляция как между ОПА и АСАТ ( $r=+0,60$ ,  $p=0,05$ ), так и между ИП и АЛАТ ( $r=+0,71$ ,  $p=0,04$ ) и ИП и АСАТ ( $r=+0,75$ ,  $p=0,029$ ).

В стадию полиорганной недостаточности перитонита активность МГ оставалась на предыдущем уровне, в то время как активность АПИ и ОПА резко повышались (соответственно на 76% и на 1237% по сравнению с предыдущей стадией, табл. 3). ИП в эту стадию также повышался.

Кроме печени, АПИ синтезируется макрофагальными клетками. Доказано, что связывание комплексов АПИ-протеиназа с соответствующими рецепторами гепатоцитов и макрофагов человека приводит к экспрессии гена АПИ и индуцирует синтез этого белка. Поэтому возможно, что при увеличении активности протеиназ происходит снижение концентрации свободного АПИ и рост концентрации комплексов АПИ-протеиназа. В результате клетки печени отвечают дополнительной продукцией нативного ингибитора, что мы и наблюдали в стадию полиорганной недостаточности.

Постоянный рост общей протеолитической активности в динамике развития перитонита обусловлен поступлением протеолитических ферментов из различных источников. Главное значение в развитии протеи-

назно-ингибиторного дисбаланса имеют гранулоциты и макрофаги, они первыми мигрируют в очаг воспаления, принимают участие в формировании гистиоцитарно-гематического барьера.

В реактивную стадию перитонита основным источником протеиназ являются сегментоядерные нейтрофилы, так как наблюдается тесная положительная корреляционная связь между ОПА, ИП и содержанием сегментоядерных нейтрофилов ( $r=+0,69$ ,  $p=0,025$  и  $r=+0,804$ ,  $p=0,009$ , соответственно, табл. 4).

Активация этих клеток в зоне воспаления сопровождается дестабилизацией их мембран, что приводит к выбросу пула активных лизосомальных ферментов. Выход лизосомальных ферментов из клеток индуцирует избирательный протеолиз, который приводит к активации плазменных проферментов систем свертывания и фибринолиза, калликреин-кининовой системы и системы комплемента. В результате накапливаются биологически активные пептиды: кинины, анафилотоксины, а также происходит потребление факторов гемокоагуляции, фибринолиза и калликреин-кининового каскада [1].

Судя по корреляционным отношениям, в реактивную стадию перитонита эндогенные ингибиторы протеиназ поставляются не только печенью, но и лейкоцитами, так как имеет-

Таблица 4  
Корреляционная зависимость между показателями протеолиза в сыворотке крови и клеточным составом крови.\*

Название показателей		n	r	p
Реактивная стадия перитонита				
МГ	Лейкоциты	11	+0,59	0,05
ОПА	Сегментоядерные нейтрофилы	10	+0,69	0,025
ИП	Сегментоядерные нейтрофилы	9	+0,804	0,009
Токсическая стадия перитонита				
МГ	Лейкоциты	10	+0,62	0,05
ИП	Лимфоциты	9	-0,71	0,03
Стадия полиорганной недостаточности				
СИЕ	Лейкоциты	8	+0,88	0,004
СИЕ	Сегментоядерные нейтрофилы	8	+0,76	0,03
СИЕ	Моноциты	8	-0,71	0,047

\*Примечание: в данной таблице приведены достоверные показатели корреляции.

ся тенденция к положительной корреляции между МГ и лейкоцитами ( $r=+0,59$ ,  $p=0,05$ ).

В токсическую стадию ингибиторный потенциал популяции в основном за счет  $\alpha_2$ -макроглобулина (коэффициент корреляции между МГ и лейкоцитами составляет  $+0,62$ ,  $p=0,05$ ). Отрицательная корреляция между количеством лимфоцитов и ИП ( $r=-0,71$ ,  $p=0,03$ ) возможно связана с разрушением последних, так как количество их в эту стадию перитонита снижалось вдвое.

Возможно, в токсическую стадию перитонита в сыворотке крови циркулируют как собственно сывороточные активированные протеиназы, так и тканевые и микробные протеолитические ферменты.

По-видимому, изменяется и функциональное «содержимое» клеток гранулоцитарного ряда. Если в реактивную стадию сегментоядерные клетки «богаты» протеиназами ( $r=+0,69$ ,  $p=0,025$  между ОПА и количеством сегментоядерных нейтрофилов), то в стадию полиорганной недостаточности, наоборот, наблюдалась положительная корреляция между количеством сегментоядерных нейтрофилов и активностью ингибиторов ( $r=+0,76$ ,  $p=0,03$ ), а также между количеством лейкоцитов и СИЕ ( $r=+0,88$ ,  $p=0,004$ ). Отрицательная корреляционная связь между активностью ингибиторов и содержанием моноцитов ( $r=-0,71$ ,  $p=0,047$ ) при росте количества последних может свидетельствовать о том, что они функционально неполноценны и не в состоянии секретировать эндогенные ингибиторы протеолитических ферментов.

Протеолитический потенциал сыворотки крови в какой-то мере обеспечивается за счет клеток крови только в реактивной стадии перитонита. Отсутствие корреляции индекса протеолиза с клеточным составом в стадию полиорганной недостаточности свидетельствует о том, что основными источниками и агрессивных протеиназ, и их эндогенных ингибиторов в эту стадию являются периферические ткани.

Анализируя изменение интенсивности протеолиза в сыворотке крови в диагности-

ческом плане, необходимо отметить, что при прогрессировании перитонита наиболее динамичными показателями являются ОПА и АПИ. ИП является более интегральным показателем, чем ОПА, который оценивает и агрессивность протеолитических ферментов, и защитную реакцию эндогенных ингибиторов. Однако этот показатель очень сильно варьировал у разных больных, особенно в стадию полиорганной недостаточности: интерквартильный размах в первые две стадии был от 0 до 4,36, в последнюю стадию – от 3,20 до 17,2.

### Выводы

1. При перитоните происходят фазные изменения активности и/или содержания компонентов системы протеолиза в сыворотке крови.

2. В сыворотке крови наиболее значимым изменениям подвергается общая протеолитическая активность, которая в стадию полиорганной недостаточности увеличивается в 13,2 раза по сравнению с токсической стадией.

3. Источником протеиназ и их эндогенных ингибиторов является не только печень, но и клетки крови – моноциты, лимфоциты, сегментоядерные нейтрофилы. В соответствии с обнаруженными корреляционными взаимоотношениями, в разные стадии перитонита участвуют различные клетки.

### Литература

1. Веремеенко, К.Н. Протеолиз в норме и при патологии / К.Н. Веремеенко, О.П. Голобородько, А.И. Кизим. – Киев: Здоров'я, 1988. – 199 с.
2. Косинец, А.Н. Протеиназы и их ингибиторы в гнойной хирургии и онкологии / А.Н. Косинец, Л.Н. Кирпиченко. – Витебск, 2003. – 410 с.
3. Хватов, В.Б. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназ в плазме крови человека: метод. рекомендации / В.Б. Хватов, Т.А. Белова; МЗ РСФСР. – Москва, 1981. – 16 с.
4. Erlanger, D.F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / D.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen // Arch. Biochem. Biophys. – 1961. – Vol. 95, N 2. – P. 271-278.

Поступила 26.12.2005 г.

Принята в печать 28.12.2005 г.